

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EFECTO ANTIMICROBIANO DEL AGUA OZONIZADA EN LOS
MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGENOS

Por

C.D. LAURA MARIEL MORILLO MONEGRO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE PERIODONCIA
CON IMPLANTOLOGÍA ORAL

Diciembre, 2016

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA POR COMITÉ DE TESIS

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL AGUA OZONIZADA EN LOS MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGENOS

(Maestría)

COMITÉ DE TESIS

Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera
Director de Tesis

Dr. Sergio Nakagoshi
Co-Director de Tesis

Dra. Adriana Herrera
Asesora Interna

Dra. Myriam de la Garza Ramos
Asesora del área de Microbiología

Dr. Gustavo Israel Martínez González
Asesor estadístico

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA POR COMITÉ ACADÉMICO

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL AGUA OZONIZADA EN LOS
MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGENOS**

COMITÉ ACADÉMICO DE MAESTRÍA

Presidente

Secretario

Vocal

DEDICATORIA

A DIOS

Porque con el todo es posible.

A MI FAMILIA

Porque sin su apoyo y su entrega incondicional
nada de esto fuera posible, ustedes son mis más grande tesoro.

A MIS AMIGOS

Por brindarme siempre su ayuda y estar presente en todo momento.

Gracias por todo su amor y entrega hacia mí,
Ustedes son parte esencial en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, a **Dios** las gracias por haberme permitido llegar hasta aquí, y por darme las fuerzas para seguir adelante a pesar de todo, sin el nada es posible y su tiempo es perfecto. A mi familia, mis padres **Jesús y Yoselin** que permitieron e hicieron posible que empezara el posgrado, son mi motor y mi inspiración, a mis hermanos **Mabell y Jesús Alfonso** por siempre apoyarme, creer en mí y estar ahí cuando más los necesito. Como también a mis tíos y primos porque de una forma u otra siempre estuvieron apoyándome.

A mis amigos (as) que siempre a pesar de la distancia estuvieron siempre pendientes de mí, a mis roomies **Eileen, Ivanna y Cesar** gracias por acompañarme durante el posgrado, por siempre estar ahí y por su apoyo, ustedes son parte de mi familia.

A mis amigos y compañeros de generación, **Bárbara, Cynthia, Jesús, Silvia y Jorge** porque durante 3 años tuvimos la dicha de compartir y cursar el posgrado juntos, a pesar de ser diferentes pudimos trabajar en equipo y llevarnos bien, mejores compañeros de generación no hubiera podido pedir, los quiero.

A mis compañeros de las demás generaciones por siempre estar dispuestos ayudar especialmente a **Alexandra**, gracias por siempre guiarme y estar ahí cuando más necesitaba.

A la **Dra. Rosa Isela Sánchez Nájera**, directora de la Facultad de Odontología de la UANL y mi directora de tesis, por extender su mano y ayudar a que todo esto fuera posible, al **Dr. Sergio Nakagoshi** mi sub-director de tesis, la **Dra. Gloria Martínez Sandoval** coordinadora del Posgrado de Periodoncia e Implantología Oral y la **Dra. Gabriela Chapa Arizpe** sub-coordinadora del Posgrado de Periodoncia e Implantología Oral, la **Dra. Adriana Herrera** maestra del posgrado de Periodoncia e Implantología Oral y mi asesora de tesis gracias por todo su apoyo y comprensión, A la **Dra. Myriam de la Garza Ramos** directora del área de Odontología del CIDICS y asesora en el área de Microbiología, gracias por su gran apoyo y dedicación, y a la **señora Vilma** asesora de laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología.

A mis maestros del posgrado, por su apoyo y guía durante todos estos 3 años de maestría.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| DEDICATORIA | IV |
| AGRADECIMIENTOS | V |
| TABLA DE CONTENIDO | VI |
| LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS | VIII |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| RESUMEN..... | X |
| ABSTRACT | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 2. HIPÓTESIS | 13 |
| 3. OBJETIVOS | 14 |
| 3.1 Objetivos General | 14 |
| 3.2 Objetivos específicos | 14 |
| 4. ANTECEDENTES | 15 |
| 4.1. Principios de la ecología microbiana | 15 |
| 4.1.1. Virulencia bacteriana | 15 |
| 4.2 Microbiología en la enfermedad periodontal..... | 16 |
| 4.2.1. Complejos microbianos..... | 18 |
| 4.3. Criterios para la determinación de un patógeno periodontal..... | 19 |
| 4.4. Patógenos oportunistas | 20 |
| 4.4.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 20 |
| 4.4.2. <i>Treponema denticola</i> | 21 |
| 4.4.3. <i>Tannerella forsythia</i> | 23 |
| 4.4.4. <i>Prevotella intermedia</i> | 24 |
| 4.4.5. <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 24 |
| 4.3. Ozono | 25 |
| 4.3.1. Ventajas del ozono..... | 26 |
| 4.3.2. Usos en odontología | 26 |
| 4.3.3. Contraindicaciones..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 5. MÉTODOS | 28 |
| 5.1 Muestra de bacterias | 28 |
| 5.2 Preparación de la Trypticaseina (Agar nutritivo) | 28 |
| 5.3 Preparación del agua ozonizada | 28 |
| 5.4 Experimento | 29 |
| 5.5 Método para evaluar la actividad antimicrobiana de los agentes químicos | 29 |
| 5.6 Métodos generales de Análisis-Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas | 30 |
| 5.7 Medición de microorganismos y cuenta de viabilidad | 30 |
| 5.8 Reto o valoración del potencial germicida | 31 |
| 6. RESULTADOS | 33 |
| 7. DISCUSIÓN | 39 |
| 8. CONCLUSIONES | 44 |
| APÉNDICES | 45 |
| LITERATURA CITADA | 46 |
| RESUMEN BIOGRÁFICO | 52 |

LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Tabla para determinar de la concentración de ozono dependiendo del flujo de oxígeno.

Tabla 2: Estadística descriptiva de las unidades formadoras de colonias según el grupo de estudio.

Gráfica 1. Media de las unidades formadoras de colonias según el grupo de estudio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Agar nutritivo (Trypticaseina)

Figura 2: Inicial, cultivo de bacteria en agar expuesta al agua ozonizada por 30 seg previos antes del ser incubada.

Figura 3: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 6

Figura 4: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 4

Figura 5: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 6

Figura 6: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 4

Figura 7: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 15

Figura 8: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 3

Figura 9: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 5

Figura 10: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 5

Figura 11: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 12

Figura 12: *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 12

Figura 13: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1

Figura 14: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 0

Figura 15: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1

Figura 16: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 15

Figura 17: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 0

Figura 18: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1

Figura 19: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 6

Figura 20: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 5

Figura 21: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 3

Figura 22: *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1

RESUMEN

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL AGUA OZONIZADA EN LOS MICROORGANISMOS PERIODONTOPAGOGENOS

Introducción: Las enfermedades periodontales son infecciones bacterianas donde los agentes bacterianos desempeñan un papel importante, ya que forman una biopelícula (placa bacteriana) y colonizan el surco gingival y superficie de la raíz. La biopelícula está compuesta por células bacterianas y complejos que se asocian e influyen en la gravedad de la enfermedad periodontal. **Objetivo:** evaluar el efecto antimicrobiano del agua ozonizada en la disminución o eliminación de bacterias periodonto-patógenas. **Método:** método cuantitativo que busca definir el porcentaje de reducción de bacterias al ponerlas en contacto con el germicida a prueba durante un tiempo específico, sembrando las bacterias en tubos de agar nutritivos inclinados e incubar durante 20 a 24 h a una temperatura de 35 grados a 37 grados C. **Resultados:** Observó una reducción significativa de *P. gingivalis* y *T. forsythia* al ser expuesta a 30 seg en una concentración de 26.8 ug/ml de agua ozonizada. Resultando en una reducción del 99.9997 % de *P. gingivalis* y 99.9999984% % de *T. forsythia*. **Conclusión:** El análisis de los resultados de esta investigación revela que *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* son bastantes sensible frente al ozono y se inhibe su crecimiento de una forma significativa. Luego de exponer la bacteria a una concentración de ozono de 26.8 ug/ml, se observó un crecimiento significativamente menor.

ABSTRACT

Introduction: Periodontal diseases are bacterial infections where bacterial agents play an important role as they form a biofilm (plaque) and colonize the gingival sulcus and root surface. The biofilm is composed of bacterial cells and associated complex and affect the severity of periodontal disease. **Objective:** Evaluate the antimicrobial effect of ozonated water in the reduction or elimination of periodontal-pathogenic bacteria. **Method:** Quantitative method that seeks to define the percentage reduction of bacteria by putting them in contact with the germicide to test for a specific time, spreading the bacteria in tubes inclined nutrient agar and incubate for 20 to 24 hours at a temperature of 35 degrees to 37 degrees C. **Results:** It was observed a significant reduction of *P. gingivalis* and *T. forsythia* when exposed to 30 sec at a concentration of 26.8 ug / ml of ozonated water. Resulting in a reduction of 99.9997% of *P. gingivalis* and *T. 99.9999984%%* of *forsythia*. **Discussion and Conclusion:** The analysis of the results of this research reveals that *P. gingivalis* and *T. forsythia* are quite sensitive to ozone and a significant growth is inhibited. After exposing the bacteria to an ozone concentration of 26.8 ug / ml, significantly lower growth was observed.

1. INTRODUCCIÓN

Las personas que presentan anomalías periodontales, por ejemplo, deficiencias de integridad o la función del tejido, se dice que presentan enfermedad periodontal. Las enfermedades periodontales son infecciones bacterianas comunes entre los seres humanos. Entre los factores etiológicos, los agentes bacterianos desempeñan un papel importante, ya que forman una biopelícula (placa bacteriana) y colonizan el surco gingival y de la superficie de la raíz. Esta biopelícula es una comunidad compuesta por células bacterianas, y a medida que va madurando los microorganismos aumentan y añaden otros, todos estos microorganismos están agrupados en complejos que se asocian con la secuencia de como colonizan la superficie dental así como también la gravedad de la enfermedad.

La terapia más efectiva hacia estas infecciones es el control de los microorganismos causales. Los estudios han demostrado que la periodontitis se puede tratar con éxito sin cirugía y/o quirúrgicamente y como coadyudante al tratamiento se utilizan antisépticos para desinfectar, uno de ellos el ozono que puede presentarse en diferentes formas: gas, agua y aceite. Hay varias acciones conocidas del ozono sobre el cuerpo humano, tales como inmunoestimulante y analgésico, antihipóxica y desintoxicante, antimicrobiana (bactericida, viricida y fungicida), bioenergética y biosintética. El efecto antimicrobiano del ozono es el más estudiado, actúa destruyendo bacterias, hongos y virus, su tasa de eliminación depende de la especie bacteriana, del tipo y concentración del ozono. En odontología es recomendado el uso de agua ozonizada como material de irrigación ya que sus efectos son probados, consistentes y con efectos secundarios mínimos, el ozono es utilizado para desinfectar y tratar enfermedades.

Se utiliza para tratar las infecciones y heridas, también el ozono posee efectos biológicos beneficiosos, como también propiedades curativas y de regeneración de tejidos que han dado resultados positivos en los diferentes procedimientos periodontales.

2. HIPÓTESIS

El ozono al ponerse en contacto con los microorganismos por un tiempo y una concentración determinada favorecerá la disminución de carga bacteriana, ya que actúa efectivamente como un agente antimicrobiano y puede presentar una buena o favorable eficiencia de destrucción contra diferentes microorganismos, en este caso los que causan la enfermedad periodontal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos General

3.1.1. Evaluar el efecto antimicrobiano del agua ozonizada en la disminución o eliminación de bacterias periodonto-patógenas.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Comprobar el efecto antimicrobiano del ozono en los microorganismos periodonto-patógenos.
- 3.2.2 Determinar mediante un análisis microbiológico si el agua ozonizada elimina las bacterias involucradas en la periodontitis crónica como: *P. gingivalis* y *T. forsythia*.
- 3.2.3 Determinar en qué concentración y en qué tiempo de exposición al agua ozonizada las bacterias son eliminadas o disminuidas.

4. ANTECEDENTES

4.1. Principios de la ecología microbiana

Ecología microbiana se ocupa de las interrelaciones entre los microorganismos y sus entornos. Un concepto clave en la ecología microbiana es el ecosistema. Un ecosistema es el complejo de organismos en un ambiente específico y el entorno no microbiano con los que se asocian los organismos.

El hábitat es el lugar en el que una población o comunidad crece, se reproduce y sobrevive. El papel de un organismo en un hábitat es su nicho. Una especie puede tener un nicho en un hábitat y un nicho diferente en otro hábitat. En el desarrollo de un ecosistema, ciertas especies denominadas organismos pioneros colonizan primero. Estas especies son a menudo reemplazadas por otras especies después de que hayan alterado el hábitat, lo que es adecuado para la colonización por otras especies. Como sucede en la cavidad oral, el desarrollo de la enfermedad periodontal proporciona un ejemplo de la sucesión microbiana así como la interacción hábitat de las especies (Socransky & Haffajee, 2005).

Las enfermedades periodontales, tales como gingivitis y periodontitis, son un grupo de enfermedades inflamatorias y multifactoriales en seres humanos y varias especies de animales, incluyendo perros, afectando los tejidos de soporte del diente. Entre los factores etiológicos, los agentes bacterianos desempeñan un papel importante, ya que forman una biopelícula (placa bacteriana) y colonizan el surco gingival y de la superficie de la raíz (Di Bello *et al*, 2014).

4.1.1. Virulencia bacteriana

El término virulencia es generalmente definida como la capacidad relativa de un organismo para causar enfermedad o para interferir con una función metabólica o

fisiológica de su huésped. Virulencia refiere a la capacidad de un microbio para expresar la patogenicidad.

Virulencia no es una propiedad separada del microbio, pero es una compleja interacción entre el microbio y su huésped; esta interacción es dependiente de muchos factores extrínsecos del medio ambiente.

El hecho de que la virulencia es un complejo de interacciones huésped-parásito, característico de ciertos microbios y no otros, ha dado lugar a un esfuerzo para definir la virulencia en términos de sus propios atributos.

Los productos finales característicos del metabolismo bacteriano, la composición química de componentes bacterianos, la capacidad de la bacteria intacta o sus partes para abrumar los mecanismos de defensa del huésped, su capacidad de invasión, y por supuesto su capacidad para matar, todos fueron utilizados para caracterizar y distinguir un microbio virulento de uno no virulento (Holt & Ebersole, 2005).

4.2 Microbiología en la enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por microorganismos que colonizan la superficie dentaria en el margen gingival (Lindhe *et al*, 2003). Las características clínicas primarias de la periodontitis incluyen la pérdida de inserción clínica, pérdida ósea alveolar, bolsas periodontales e inflamación gingival. Además, la recesión gingival, el sangrado de la encía después de la aplicación de presión, movilidad aumentada, migración, y/o exfoliación dental (Flemming, 1999).

El área de superficie 215 cm² de la cavidad oral presenta numerosas superficies para la colonización microbiana. Las diversas superficies mucosas están revestidos por diferentes tipos de epitelio, mientras que las superficies duras son presentadas por los dientes o varios tipos de reemplazos. Estas superficies están bañadas continuamente por un fluido, principalmente la saliva, y por lo tanto proporcionan excelentes entornos para el desarrollo de biopelícula (Collins & Dawes, 1987).

Biopelícula bacteriana se define como una comunidad estructurada de células bacterianas incluidas en una matriz polimérica de producción propia (Costerton *et al*, 1999).

La composición de la placa supragingival con un desarrollo de 7 a 10 días es principalmente de *Streptococci* y *Actinomyces*. Cuando la placa madura, estos microorganismos aumentan y se añaden otros tales como *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Treponema* y especies de *Bacteroides* (Socransky, 1977).

La placa subgingival contiene más de 700 especies de bacterias, y algunos de estos microorganismos han demostrado ser responsable de la iniciación / progresión de las enfermedades periodontales (Suzuki *et al*, 2013).

El complejo de microorganismos que comprende *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* y el complejo de *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. Micros*, *F. nuc vincentii*, *F. nuc. Nucleatum*, *F. nuc polymorphum* y *F. periodonticum* se pueden detectar con más frecuencia, en mayores proporciones en pacientes con periodontitis, que en pacientes periodontalmente sanos (Kumar *et al*, 2003).

El detonador para el inicio de la enfermedad es la presencia de complejos microbianos que colonizan las regiones sulculares entre la superficie del diente y el margen gingival a través interacciones específicas y acumulación debido a los cambios de arquitectura en el surco (Miyamoto *et al*, 1991).

Investigadores han catalogados y estratificación la microbiota en grupos o complejos, lo que representa consorcios de bacterias que parecen ocurrir juntos y que están asociados con los biopelículas de la salud gingival, gingivitis y periodontitis (Haffajee & Socransky, 1994). Los diferentes complejos microbianos se han asociado con la secuencia de la colonización en la superficie del diente, así como con la gravedad de la enfermedad. El Complejo rojo, que aparece más adelante en el desarrollo de la biopelícula, comprende especies que se consideran patógenos periodontales. Su concepto del complejos/consorcio microbiano en esta biopelícula ha proporcionado una más centrada definición de la función y la distribución de las diferentes especies de bacterias en la enfermedad periodontal (Holt & Ebersole, 2005).

4.2.1. Complejos microbianos

- Complejo amarillo: compuesto por especies como los *Streptococcus*, incluyendo, *streptococcus sanguis* y *streptococcus oralis*.
- Complejo púrpura: consiste en *Actinomyces odontolyticus* y *Parvula Veillonella*. Junto con los *Actinomyces*, se pensaba que estas especies eran los primeros colonizadores.
- Complejo verde: compuesto por *Capnocytophaga spp*, *concisus Campylobacter*, *Eikenella corrodens*, y *A. actinomycetemcomitans* un grupo de bacterias que existen en la biopelícula, asociados con otras especies bacterianas individuales.
- Complejo naranja: consiste en *Fusobacterium spp*, *Prevotella spp*, *Micromonas micros* (*micros Peptostreptococcus*), *Campylobacter spp*, *Eubacterium spp* y *Streptococcus constellatus*. Tienen capacidades fisiológicas de uso y de liberación de sustancias nutritivas en la biopelícula, y el reconocimiento de que expresan las estructuras de la superficie celular y se pueden unir a los primeros colonizadores y a los miembros del complejo rojo.
- Complejo rojo: compuesto de tres bacterias específicas: *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*. La agrupación se consideró el complejo más significativa en la progresión de la enfermedad periodontal debido a que los miembros de este consorcio aumenta en el número y la prevalencia con el aumento de los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal. *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* se encuentran juntos en muestras de placa a menudo adyacentes a la capa epitelial de la cavidad periodontal de surco gingival (Socransky & Haffajee, 2005) (Socransky *et al*, 1998).

Investigadores han observado la relación entre las especies del consorcio complejo rojo, y han mostrado una fuerte relación entre *T. forsythia* y *P. gingivalis* en las placas subgingivales tomadas a diferentes profundidades de las bolsas. *P. gingivalis* no se detectó en la ausencia de *T. forsythia*.

Este trabajo apoya la idea de que no hay una especie bacteriana individual en la etiología de la progresión de la enfermedad periodontal, pero que las especies bacterianas de la cavidad oral existen como complejos dentro de la matriz de la biopelícula y son estos complejos que parecen estar obligados a iniciar el proceso de la enfermedad. (Gmür *et al*, 1989).

La mayoría de las especies del complejo naranja y todas las especies del complejo rojo se incrementan significativamente con el aumento de profundidad de la bolsa.

Bolsas más profundas tienen una mayor área de superficie epitelial de las especies del complejo rojo como *P. gingivalis* y *T. denticola* pueden adjuntar.

Los miembros de los complejos rojo y naranja son significativamente elevados en los sitios que exhiben sangrado al sondeo, que fue utilizado como un indicador clínico de la inflamación periodontal (Socransky & Haffajee, 2005).

Los miembros del complejo de color rojo son bacterias anaerobias Gram negativas que expresan numerosos factores de virulencia permitiendo que las bacterias puedan colonizar los sitios subgingivales, perturbar el sistema de defensa del huésped, invadir y destruir el tejido periodontal, así como promover la respuesta del huésped inmunodestructiva (Bodet *et al*, 2007).

4.3. Criterios para la determinación de un patógeno periodontal

- Asociación con la enfermedad: el patógeno no tiene que ser un miembro predominante de la microbiota periodontal. patógenos periodontales solamente representan aproximadamente el 1-5% en la periodontitis crónica.
- Eliminación o supresión del organismo: La progresión de la periodontitis se detiene si el patógeno se suprime por una forma apropiada. muchas personas periodontalmente sanos tienen bajos niveles de patógenos periodontales como parte de su microbiota endógena subgingival.
- Respuesta del huésped
- Mecanismos de patogenicidad: el microorganismo debe poseer una serie de factores de virulencia que promueven su capacidad de iniciar y perpetuar en eventos inflamatorios e inmunológicos que dan como resultado daños periodontales (Armitage, 2010).

4.4. Patógenos oportunistas

4.4.1. *Porphyromonas gingivalis*

Es un anaerobio oral Gram-negativo que está implicado en la patogénesis de la periodontitis (Bodet *et al*, 2007). Puede invadir localmente los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del huésped. Al hacer esto, se utiliza un panel de factores de virulencia que causa la disregulación de la respuesta inmune e inflamatoria innata.

Porphyromonas gingivalis activa autofagia celular para proporcionar un nicho replicativo mientras que suprime la apoptosis. Su capacidad para causar periodontitis en adultos es determinada por su arsenal de factores de virulencia. Está fuertemente correlacionada con periodontitis crónica. Su persistencia crónica en el periodonto depende de su capacidad para evadir la inmunidad del huésped sin inhibir la respuesta inflamatoria general, que es realmente beneficioso para esta y otras bacterias periodontales. Se adhiere, invade y se replica dentro de las células epiteliales humanas (Mysak *et al*, 2014).

Produce una gama considerable de factores de virulencia, importante miembro de la microbiota patógena en diversas enfermedades periodontales que se caracteriza por la pérdida de hueso alveolar (Yun *et al*, 1999).

Se ha demostrado que poseen distintas moléculas/estructuras que son esenciales para la interacción con el huésped. Específicamente, esta especie ha demostrado ser capaz de adherirse a una variedad de tejidos del huésped y las células, y para invadir estas células y multiplicarse (Holt *et al*, 1999).

La adherencia bacteriana a las superficies de la mucosa y de los dientes, así como coagregación bacteriana son pasos esenciales para la colonización de diversas especies bacterianas orales. Las fimbriae de *P. gingivalis* son determinantes críticos para cada uno de estos procesos. Es capaz de coagregarse con *Actinomyces Naeslundii* 2 (*Actinomyces viscosus*), *Streptococcus gordonii*, y *S. mitis*. Varios otros estreptococos orales puede coagregarse con *P. gingivalis* (Holt & Ebersole, 2005).

Coagregación de *P. gingivalis* con ambas *S. oralis* y *S. gordonii* es inhibida por la clorhexidina y el peróxido de hidrógeno, lo que demuestra tanto la actividad de concentración inhibitoria mínima, lo que sugiere cierta especificidad para el proceso de unión (Lee, 2001).

La interacción de *P. gingivalis* y de otros miembros del complejo rojo con las células epiteliales en el entorno subgingival ofrece una excelente estrategia para la destrucción final de los tejidos del huésped. Anatómicamente, cuando una superficie del diente sano está expuesta a las bacterias que forman el biopelícula, inicialmente se unen a la superficie del diente y se extienden hacia abajo en el surco gingival (Holt & Ebersole, 2005).

Las células del epitelio de unión son por lo tanto directamente expuestas a las bacterias y sus productos. Mientras que *P. gingivalis* se ha reportado en los tejidos gingivales, y algunas cepas de *P. gingivalis* se han encontrado dentro de las células epiteliales, en lo que presumiblemente son capaces de crecer y reproducirse (Lee, 2001).

La interacción inicial de *P. gingivalis* con estructuras de acogida se produce en presencia de varias proteínas del huésped, incluyendo fibrinógeno, histatinas, y fibronectina (Darveau, 2014). *Porphyromonas gingivalis* provoca la resorción ósea alveolar y medidas morfológicas son los métodos más frecuentes para identificar la resorción ósea en estudios periodontales (Mysak *et al*, 2014).

4.4.2. *Treponema denticola*

T. forsythia fue inicialmente un enigma taxonómico, ya que no se parecía a especies de bacilos anaerobios gram-negativos entéricos orales, en particular en su morfología celular y requisitos de crecimiento lento. Como una varilla anaeróbica gram-negativa con los extremos afilados, fue descrita como *Bacteroides fusiformes* (Tanner *et al*, 1979).

Un miembro de la treponema oral. Una gran cantidad de evidencia experimental apoya la importancia de los treponemas orales, incluyendo *T. denticola*, en la progresión de las enfermedades periodontales (Tal, 1980). Esta bacteria gram-negativa anaerobia obligada, de rápida movilidad, se ha estimado para dar cuenta de aproximadamente el 50% del total de bacterias presentes en una lesión periodontal (Moore & Moore, 1994).

T. denticola interactúa con otras especies bacterianas orales, en particular *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Esta coagregación probablemente juega un papel en la progresión de la enfermedad periodontal (es decir en la formación de la biopelícula), se ha informado que estos dos miembros del complejo rojo están físicamente relacionados en la formación de biopelícula (Kolenbrander *et al*, 2002).

Coagregación entre *P. gingivalis* y *T. denticola* es mediada por la proteína dentilisin. *P. gingivalis* es más común en las etapas posteriores de periodontitis junto con *T. denticola*, es posible que en la coagregación se observó funciones para el transporte de *P. gingivalis* a las regiones más profundas de la bolsa periodontal en desarrollo.

Estos lugares podrían ser más propicios para el crecimiento de *P. gingivalis* (siendo más anaeróbico), así como proporcionar un entorno nutricional más rico (de exudado del surco gingival) (Holt & Ebersole, 2005).

T. denticola tenían un efecto significativo sobre la viabilidad de las células epiteliales humanas, con un número elevado de desafío que conducen a la producción de dos tipos de células de la línea KB: una se libera del sustrato y muere, y la otra queda adjunta. Las células unidas fueron viables después de la transferencia; sin embargo, no parece haber una reducción significativa en el volumen global de las células (Moore y Moore, 1994). El hecho de que *T. denticola* es altamente proteolítica sugiere que estas bacterias son capaces de ejercer un efecto negativo sobre componentes de la matriz de fibroblastos.

Mientras que *P. gingivalis* disminuye de la producción de colágeno por los fibroblastos gingivales humanos, *T. denticola* aumenta la producción de esta matriz extracelular del tejido. Estos hallazgos sugieren que los diversos microorganismos orales podrían minimizar la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas de las lesiones periodontales (Marquez *et al*, 2003).

4.4.3. *Tannerella forsythia*

Tercer miembro del complejo rojo, el aislamiento original, identificado como un *Bacteroides fusiformes* (Tanner *et al*, 1979). El microorganismo se aisló con frecuencia junto con *P. gingivalis* de los casos de periodontitis crónica activa, y ha sido frecuentemente asociado con la enfermedad periodontal crónica. Su papel exacto en la destrucción severa del hueso y el tejido en los sitios de los que se pueden aislar, no se ha determinado (Grossi, 2001).

Múltiples estudios evalúan la presencia de *T. forsythia* en la placa subgingival han demostrado una frecuencia significativamente mayor en sujetos enfermo en comparación con los controles sanos.

Los niveles de *T. forsythia* son significativamente elevados en los sitios con sangrado al sondaje, en comparación con los sitios no sangrado. También ha sido identificada en muestras de placa subgingival de los adultos y los niños, así como en muestras de saliva, en particular de los sujetos con periodontitis (Ximenez-Fyvie, 2000).

T. forsythia se ha estudiado que expresa una serie de actividades enzimáticas y proteolíticas que podrían contribuir a su capacidad para competir eficazmente en el complejo de la biopelícula del surco gingival. *T. forsythia* parece invadir la bolsa periodontal junto con *P. gingivalis* (y *T. dentícola*) y estas especies podrían ser atacados por las células blancas de la sangre del huésped (Holt & Ebersole, 2005).

Coagregación se ha sugerido que una estrategia de colonización crítica de los microorganismos orales, que implican numerosas superficies y receptores, que se han sugerido para ayudar e instruir la construcción de los complejos de la biopelícula.

Se ha observado que *P. gingivalis* produce una serie de moléculas de la superficie y las estructuras que le permiten interactuar con múltiples especies de la biopelícula, incluidos los demás miembros de este consorcio, es decir *T. dentícola* y *T. forsythia*. Por lo tanto, *P. gingivalis*, en particular, ha desarrollado múltiples, interfaces y estrategias moleculares para mejorar la continua colonización del huésped a través de la población humana, lo que sugiere una selección evolutiva importante para esta especie que es un componente crítico de la patogenicidad de la biopelícula.

4.4.4. *Prevotella intermedia*

P. intermedia también se ha asociado con periodontitis de inicio temprano generalizadas. Se ha encontrado en una mayor prevalencia y en mayor número y puede ser un organismo predominante (Chung *et al*, 1989). Es un anaerobio obligatorio, varilla-negro pigmentada, gram-negativa que se asocia frecuentemente con la enfermedad periodontal: periodontitis del adulto, la gingivitis ulcero necrosante aguda, y la gingivitis del embarazo. Este organismo también está implicado en infecciones extraorales como la infección de la nasofaringe y la infección intra-abdominal (Mättö *et al*, 1997).

Se reconoció que existe una gran heterogeneidad dentro de las cepas *P. intermedia* en términos de la serología y la homología de ADN. En 1992 se propuso que *P. intermedia* puede clasificar en dos genospecies, *P. intermedia* y *Prevotella nigrescens*. Estudios previos sugieren que *P. intermedia* es probable que sea más asociada con los sitios periodontales, mientras que *P. nigrescens* puede estar asociada frecuentemente a la encía sana (van Steenberghe *et al*, 1997).

4.4.5. *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum es una bacteria anaerobia invasivo que está asociada con la enfermedad periodontal (Bui *et al*, 2016). Anaerobio fusiforme gram-negativa. Se ha encontrado en pacientes con periodontitis de aparición temprana localizados, es la causa principal y más frecuente de gingivitis (Mandell *et al*, 1987).

Es un componente estructural clave de la placa dental normal y enfermedades asociadas, son notables por sus interacciones específicas con varias especies de bacterias orales, como lo ilustra la asociación con cocos gram-positivos y se identifica como organismo de coagregación (Suchett-Kaye *et al*, 1999).

La importancia central de *F. nucleatum* en la arquitectura de la placa ha aumentado el interés en el papel del organismo como un patógeno oportunista, y en sus proteínas de superficie que pudieran estar implicados en la adhesión y agregación conjunta con otras bacterias (J Duncan, 2005). Es una importante especie de puente que facilita la actividad de los colonizadores de la biopelícula dental (Mendes *et al*, 2016).

4.3. Ozono

Las enfermedades gingivales y periodontales representan una gran preocupación en odontología, la mayoría de las causas y los factores que contribuyen en la etiología de la enfermedad son reducidos y tratados con la aplicación de ozono en diferentes formas (gas, agua, aceite). El ozono (O_3), un gas descubierto en la mitad del siglo XIX, es una molécula compuesta por tres átomos de oxígeno en una estructura dinámica inestable debido a la presencia de estados mesoméricos. El gas es incoloro y explosivo en forma líquida o sólida. Aunque O_3 tiene efectos peligrosos, sin embargo, los investigadores creen que tiene muchos efectos terapéuticos (Shoemaker, 2011).

Sus efectos son probados, consistente y con efectos secundarios mínimos. O_3 médico, utilizado para desinfectar y tratar la enfermedad. Se utiliza para tratar las infecciones, heridas y múltiples enfermedades (Patel *et al*, 2012).

El ozono dentro de la medicina ortodoxa, es relevante por su efecto antimicrobiano, su forma tópica ha producido efectos positivos en la cicatrización, actuando también como antibiótico y quimioterapéutico para combatir patógenos resistentes (Sunnen, 1988).

Hay varias acciones conocidas del ozono sobre el cuerpo humano, tales como inmunoestimulante y analgésico, antihipóxica y desintoxicante, antimicrobiana (bactericida, viricida y fungicida), bioenergética y biosintética (activación del metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, lípidos) (Gupta & Mansi, 2012).

Efecto antimicrobiano del ozono es el más estudiado. La razón principal de la muerte celular es el daño local de la membrana citoplasmática debido a ozonolisis de enlaces dobles, y también ozono inducida por la modificación de los contenidos intracelulares (oxidación de las proteínas, de la pérdida de las funciones organel) debido a los efectos secundarios oxidantes. El efecto antimicrobiano actúa destruyendo bacterias, hongos y virus. La acción del efecto antimicrobiano es no específica, y no daña las células del cuerpo humano por su habilidad anti oxidativa (Tondij *et al*, 2001).

4.3.1. Ventajas del ozono

- Acción no específica y selectiva a las células microbianas; no daña las células del cuerpo humano debido a su capacidad antioxidante importante.
- Eficiente en antibióticos cepas resistentes (Krammer, 1983).
- Provoca la síntesis de sustancias biológicamente activas tales como interleucinas, leucotrienos y prostaglandinas.
- Estimula la proliferación de las células inmunocompetentes y síntesis de inmunoglobulinas.
- Activa la función de los macrófagos y aumenta la sensibilidad de los microorganismos a la fagocitosis (Newman *et al*, 2002).

4.3.2. Usos en odontología

El uso del ozono en odontología está ganando sitios en la práctica dental diaria, el indiscutible poder de desinfección del ozono sobre otros antisépticos hace el uso del ozono en odontología una muy buena alternativa y/o un desinfectante alternativo.

El O₃ en gas no era recomendado para usos intra-orales. Solo ozono disuelto en agua o aceite de ozono eran y son comúnmente usados en diferentes casos de odontología. Gas de O₃ ya puede ser utilizado con seguridad en situaciones donde la difusión es un factor importante.

De acuerdo al dentista Fritz Kramer, el ozono, tanto en la forma mezclado con agua puede ser utilizado:

- Como poderoso desinfectante.
- Para controlar el sangrado.
- Limpiar heridas en huesos y tejido blando.
- Incrementar el suplemento local de oxígeno en el área de la herida, el ozono puede estimular la cicatrización.

- El agua ozonizada puede aumentar la temperatura en el área de la herida, y esto incrementa el proceso metabólico relacionado con la cicatrización de la herida (Ebensberger *et al*, 2002).

La irrigación con agua ozonizada puede ser usada para irrigar un área afectada durante y luego de raspado y alisado, y curetaje de la raíz no quirúrgico. También puede ser utilizado como material de irrigación durante un procedimiento quirúrgico y/o al final para el lavado del área intervenida. Las suturas puede ser cubierta con una pequeña capa de aceite ozonizado y el paciente puede ser instruido a que aplique 3-4 veces al día (Claffey *et al*, 2004).

4.3.3. Contraindicaciones

- Embarazadas
- Hipotiroidismo
- Anemia severa
- Hemorragia activa
- Intoxicación agua por alcohol
- Infarto al miocardio reciente (Nagayoshi *et al*, 2004).

5. MÉTODOS

5.1 Muestra de bacterias

Se utilizaron bacterias previamente cultivadas de *P. gingivalis* y *T. forsythia*, y se determinó el efecto antimicrobiano del agua ozonizada exponiéndolas a este medio por 30 segundos y luego realizando el conteo microobiano en las placas Petri luego de incubarlas por 24h.

5.2 Preparación de la Trypticaseina (Agar nutritivo)

La tripticaseina de soya (Agar nutritivo) utilizado para favorecer el cultivo y aislamiento de microorganismos. Se suspende 30g del medio en un litro de agua purificada, se mezcla con agitación suave hasta su completa disolución. Se esteriliza en autoclave a 121 grados C durante 30 minutos.

1l (1000 ml) ---- 30g

400 ml = 12g de polvo



Fig. 1. Agar nutritivo (Trypticaseina)

5.3 Preparación del agua ozonizada

200ml de agua destilada en un recipiente oscuro con cierre hermético, se introduce el aparato generador de ozono modelo Biozon Oxy.

-200ml agua destilada

-1 Oxígeno

-120 segundo el aparato dentro del agua destilada

-Concentración total del ozono: 26.8 ug/ml.

| Flujo de Oxígeno (LPM) | Flujo de Oxígeno (LPM) | Concentración Ozono ug/ml |
|------------------------|------------------------|---------------------------|
| 0.06 | 1/16 | 52.4 |
| 0.12 | 1/8 | 45.4 |
| 0.25 | 1/4 | 33.9 |
| 0.5 | 1/2 | 26.8 |
| 0.75 | 3/4 | 23.1 |
| 1 | 1 | 18.2 |
| 1.5 | 1 1/2 | 14.1 |
| 2 | 2 | 11.2 |

Tabla I. Tabla para determinar de la concentración de ozono dependiendo del flujo de oxígeno.

5.4 Experimento

En un tubo se colocó 90 microlitros de agua más 10 microlitros de cultivo de bacterias. Esos 100 microlitros fueron colocados en un matraz con 100 ml de agua ozonizada por 30 segundos, luego se obtuvo 100 microlitros de esa solución y fueron colocadas en 10 cajas Petri a las que se les colocó agar nutritivo de soya, se gelifican y se incubaron por 24 horas a 37 grados C.

5.5 Método para evaluar la actividad antimicrobiana de los agentes químicos

Se mide por su capacidad antiséptica o desinfectante, y por su toxicidad en animales o en el hombre se realiza de acuerdo con los procedimientos y estándares establecidos por la FDA.

En México, la Secretaria de Salud marca sus distintas guías y documentos oficiales la terminología que marca la diferencia entre los tipos de germicidas como antisépticos, desinfectantes y esterilizantes, sin embargo, no existen pruebas para valorar la capacidad de los productos que afirman tener potencial esterilizante, desinfectante o antiséptico.

La norma que marca el análisis del potencial germicida de diversos químicos es la NMX-BB-040-SCFI-1999.

5.6 Métodos generales de Análisis-Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas

Esta norma tiene como objetivo valorar la actividad antimicrobiana de productos germicidas líquidos mediante la exposición de dos bacterias muy resistentes al producto que se quiere probar.

Es un método cuantitativo que busca definir el porcentaje de reducción de bacterias al ponerlas en contacto con el germicida a prueba durante un tiempo específico. Con este método se busca comprobar si el químico germicida, es capaz de eliminar el 99.9999% de UFC. Esta norma recomienda conservar bacterias o microorganismo sembrándolas en tubos de agar nutritivos inclinados e incubar durante 20 a 24 h a una temperatura de 35 grados a 37 grados C y a continuación refrigerarlos.

Para el uso de estas cepas, tomar las muestras refrigeradas y remover el crecimiento de forma cuidadosa con un asa bacteriológica estéril (se recomienda un asa con alambre largo para facilitar la manipulación y recolección de la muestra dentro del tubo) y sembrar en tubos inclinados con 12 mL de agar nutritivo (de preferencia tubos de boca ancha) e incubar bajo las condiciones antes mencionadas. De 20 a 24 h después de incubadas las muestras se debe de agregar a cada tubo 3 mL de solución salina estéril y remover el crecimiento del tubo con cuidado con el asa bacteriológica estéril de manera que este quede suspendido en la solución salina. Luego se vacía la suspensión en un tubo con solución salina estériles para después mezclar bien la muestra en la suspensión y poder medirla.

5.7 Medición de microorganismos y cuenta de viabilidad

La concentración de microorganismos de la suspensión se mide en el espectrofotómetro, se coloca una muestra de 1 mL en la cubetilla, se ajusta para que tenga una longitud de onda de 580 nanómetros y de esta manera lea la transmitancia de la muestra que este entre 3 y 5%, si esta da una concentración menor al rango pedido (2.8 a 1.8%) la suspensión del tubo se diluye más con solución salina estéril, por lo contrario, si la concentración es mayor a lo requerido se debe agregar el contenido de otro tubo de agar al tubo con la suspensión.

Se pide manejar estos valores de transmitancia, ya que estos representan de forma teórica una concentración de 75 a 125 x 10⁸ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Para comprobar que se tenga esta cantidad de UFC/mL se realiza el siguiente procedimiento.

Se toma una muestra de 1 mL de la suspensión con la concentración indicada o tubo madre, se coloca en un matraz de 200 mL con 99 mL de solución amortiguadora de fosfatos y se instala está en el vórtex o se revuelve de forma uniforme, después se obtiene una disolución de 1 en 100 y se toma 1 mL de esta suspensión, se diluye en un tubo de ensayo con 9 mL de la solución amortiguadora de fosfatos obteniendo una disolución de 1 en 1000 o a la -3 y se repite este último paso hasta llegar al sexto tubo, 1 en 100 millones o dilución a la -8.

Para poder hacer el conteo de las UFC se realiza una medición de una muestra de 1 mL de cada dilución en el espectofotómetro y se vacía en dos placas o cajas de Petri por individual 1 mL de cada dilución, a continuación se le agregan de 15 a 18 mL de agar estándar y se homogeneiza el contenido de cada caja de Petri haciendo un movimiento circular o en forma de 8 (ocho) hasta obtener una consistencia gelatinosa del agar. Después se transporta a la caja de Petri a la incubadora y se incuba por 48 h para medir el crecimiento de UFC en estas. Se debe observar en la sexta caja un crecimiento estimado de 7.5 a 12.5 UFC, en la quinta de 75 a 125 UFC y un crecimiento por 10 conforme disminuye la dilución de forma consecutiva.

Un número más alto de UFC indica mayor supervivencia de microorganismos, mientras que un número menos de UFC muestra menos supervivencia o viabilidad de estos y quizás el experimento tenga que desecharse o repetirse.

5.8 Reto o valoración del potencial germicida

Similar al método anterior o de medición de viabilidad y simultaneo, se toma una muestra de 1 mL de la suspensión del tubo madre y se suspende o deposita en un matraz de 200 mL con 99 mL de la solución germicida, se mezcla este por 30 seg, se toma una muestra de 1 mL de esta suspensión y se deposita en un tubo de ensayo con 9 mL de solución neutralizante, la cual detiene la acción del germicida, se toma una muestra de 1 mL de

ese tubo y se diluye en otro con 9 mL de la solución neutralizante y se repite el procedimiento hasta llegar al sexto tubo.

De cada tubo se toma una muestra de 1 mL, se vacía en dos cajas Petri, se les agregan de 15 a 18 mL de agar neutralizante que se asegura de neutralizar el germicida y proporcionar un medio propicio para el desarrollo de las UFC, y a continuación se homogeneiza el contenido de cada caja con movimientos circulares en forma de ocho para alcanzar una consistencia gelatinosa del agar y llevar a incubar 48 h, posteriores a las cuales se observan y se mide el crecimiento de UFC en caso de haber.

Para conocer el porcentaje de reducción se hace una comparación entre el promedio de las UFC sobrevivientes de la cuenta de viabilidad con las sobrevivientes del resto de la siguiente manera:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - S \times 100 / CV$$

S: significa células sobrevivientes

UFC/MI y CV: la cuenta viable inicial.

Un producto considerado germicida debe ser capaz de eliminar o reducir en 30 seg de contacto 99.9999% de UFC en una suspensión que contenga de 75 a 125 x 10⁸ UFC/mL.

6. RESULTADOS

10 muestras de las bacterias expuestas al agua ozonizada fueron colocadas en 10 cajas Petri para luego ser incubadas por 24 horas (Fig. 1). Una vez pasadas las 24 horas de incubación, se podía observar en la placa Petri con respecto a *P. gingivalis* y *T. forsythia* las bacterias viables que quedaban luego de la exposición, estas fueron contadas y se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) para así determinar la actividad antimicrobiana del ozono.

6.1 Evaluación de UFC de *P. gingivalis*

Las cajas Petri presentaban UFC desde 3 hasta 15, la mayoría de las cajas Petri presentaban una cantidad reducida de UFC. Otras presentaban una mayor cantidad (Fig. 6) aproximadamente 15 UFC donde el agua ozonizada tuvo un menor efecto antimicrobiano a diferencia de otras muestras donde se puede observar un menor número de UFC con aproximadamente 3 UFC (Fig. 7) en este caso el efecto antimicrobiano del agua ozonizada fue mayor. Al igual que otras de las muestras donde la cantidad de UFC fue de 5 (Fig. 8) (Fig. 9).

Hubo una reducida formación de bacterias en algunas zonas, al ser expuesta a 30 seg en una concentración de 26.8 ug/ml de agua ozonizada. Resultando en una reducción del 99.9997 % de *P. gingivalis* (Tabla 2).



Fig. 2. Inicial, cultivo de bacteria en agar expuesta al agua ozonizada por 30 seg previos antes del ser incubada.



Fig. 3. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 6



Fig. 4. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 4

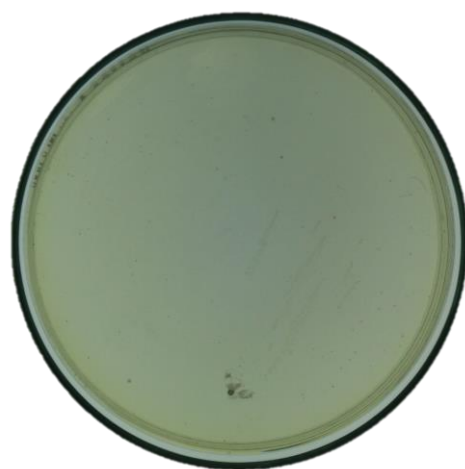


Fig. 5. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 4

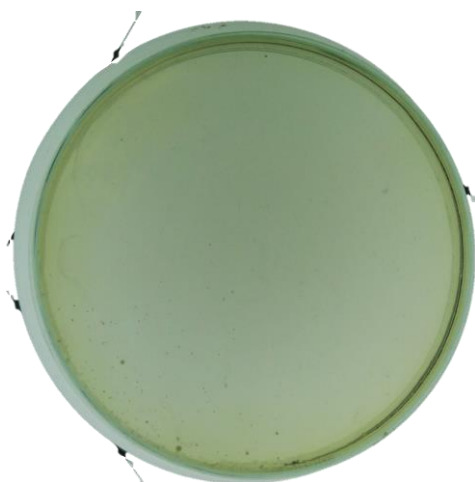


Fig. 6. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 4



Fig. 7. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 15



Fig. 8. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 3



Fig. 9. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 5



Fig. 10. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 5



Fig. 11. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 12



Fig. 12. *P. gingivalis*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 12

6.2 Evaluación de UFC de *T. forsythia*

T. forsythia presentó una cantidad reducida UFC a diferencia de *P. gingivalis*. En este caso iban de 0 (Fig. 13) a 15 (Fig. 15) UFC. Siendo mayor el efecto antimicrobiano del ozono en este tipo de bacteria.

Se pudo observar una reducción significativa de *T. forsythia* al ser expuesta a 30 seg en una concentración de 26.8 ug/ml de agua ozonizada. Resultando en una reducción del 99.9999984% % de *T. forsythia* (Tabla 2).

Se ha probada las soluciones de manera pura sin hacer combinaciones de microorganismos.



Fig. 13. *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1

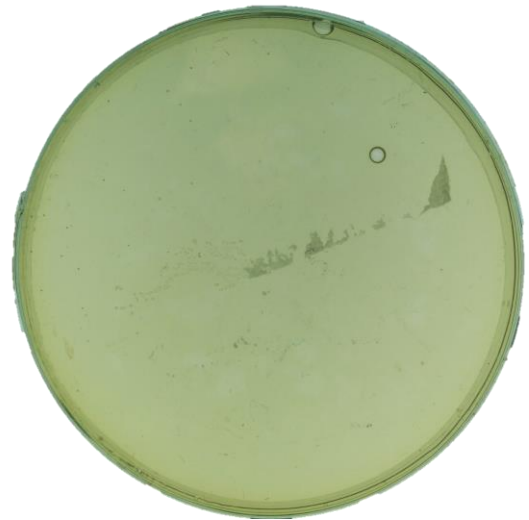


Fig. 14. *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 0



Fig. 15. *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1



Fig. 16. *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 15



Fig. 17. *T. fosythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 0



Fig. 18. *T. fosythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1



Fig. 19. *T. fosythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 6

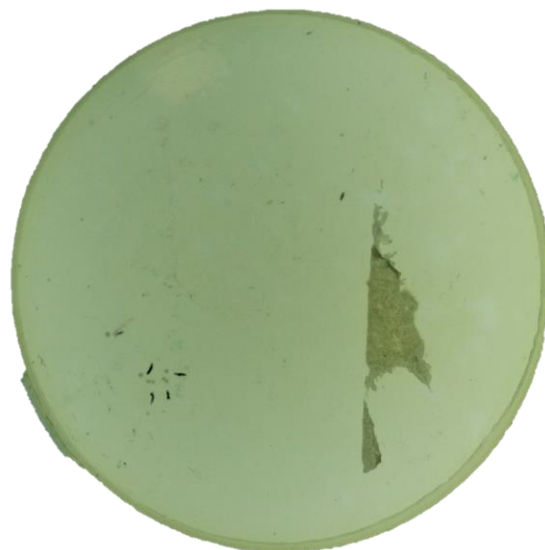


Fig. 20. *T. fosythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 5



Fig. 21. *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 3



Fig. 22. *T. forsythia*, luego de 24 horas de incubación. UFC: 1

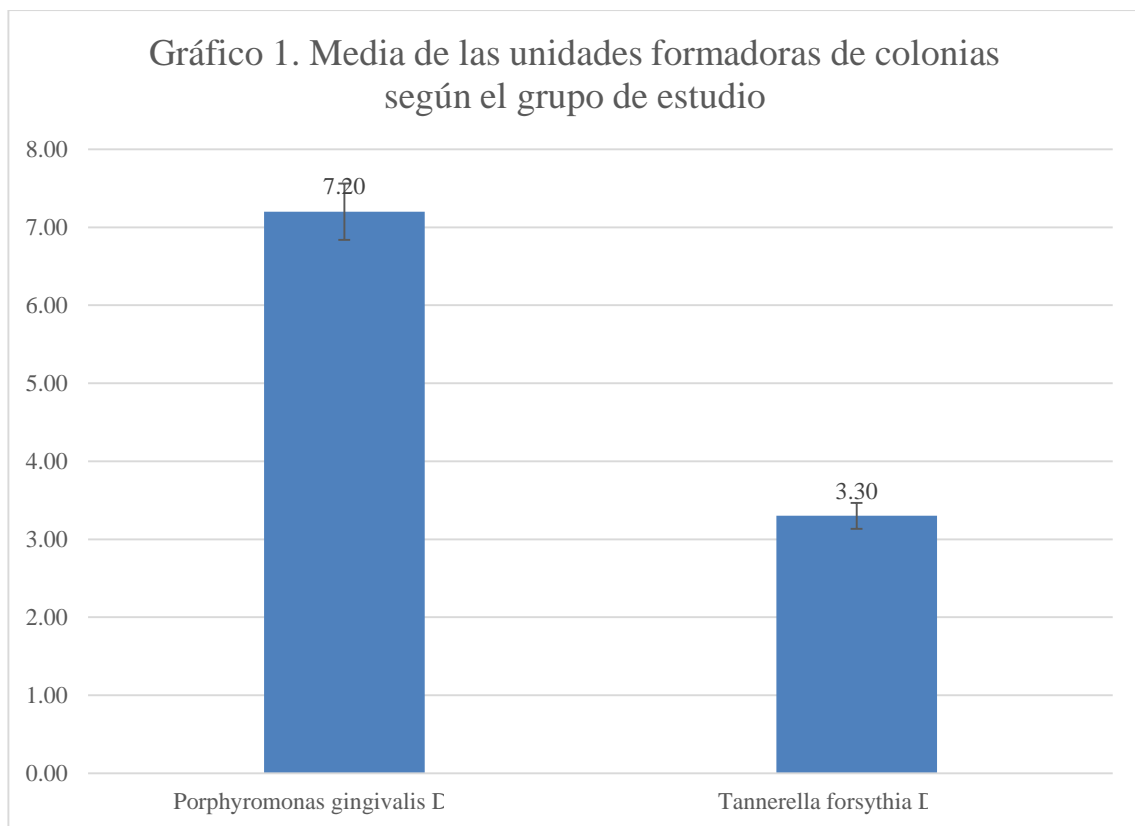
Tabla 2.
Estadística descriptiva de las unidades formadoras de colonias según el grupo de estudio

| | Media | Moda | Mediana | DE | Var | Min | Max | Rango | IC 95% | |
|---|-------|------|---------|------|-------|-----|-----|-------|--------|------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> D.O: 2.4 | 7.20 | 6 | 5.50 | 4.18 | 17.51 | 3 | 15 | 12 | 5.88 | 8.52 |
| <i>Tannerella forsythia</i> D.O:2.1 | 3.30 | 1 | 1.00 | 4.60 | 21.12 | 0 | 15 | 15 | 1.85 | 4.75 |

DE= Desviación estándar, Var= Varianza, Min= Valor mínimo, Max= Valor máximo, IC 95%= Intervalo de confianza (95%)

D.O: 2.1

D.O: 2.4



7. DISCUSIÓN

Las infecciones se inician generalmente por la adhesión de las bacterias a una amplia variedad de superficies de acogida, luego de que estas se adhieren sucede una serie de eventos iniciados en el huésped como son el crecimiento bacteriano, formación de la biopelícula y la entrada del patógeno en las células huésped y/o tejidos y la interferencia con el sistema de defensa inmunológico. Estos microorganismos se dividen en diferentes complejos dependiendo de su patogenicidad, las enfermedades periodontales son causadas por una serie de respuestas inflamatorias iniciadas por la infección de un pequeño subconjunto de diferentes bacterias como son: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia* y *Treponema Denticola* (Klanova, 2006), que son las responsables de la enfermedad periodontal crónica. Para el tratamiento de estas enfermedades existen procedimientos que tienen como objetivo eliminar la biopelícula que está compuesta por células bacterianas que influyen en la gravedad de la enfermedad periodontal y como complemento a estos tratamientos pueden ser utilizados diferentes tipos de materiales irrigadores uno de ellos el agua Ozonizada.

Se ha comprobado que el ozono posee propiedades antimicrobianas de amplio espectro, ha sido estudiado en Odontología como una posible alternativa de agente antiséptico, ya que presenta un efecto antimicrobiano frente a bacterias periodontopatógenas como son *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, y *Prevotella intermedia*. El propósito de esta investigación es comprobar el efecto antimicrobiano del ozono en los microorganismos periodonto-patógenos y determinar mediante un análisis microbiológico si el agua ozonizada elimina las bacterias involucradas en la periodontitis crónica como: *P. gingivalis* y *T. forsythia*.

Varios estudios clínicos e in vitro han reportado que el ozono, ya sea de forma gaseosa o acuosa posee un efecto antimicrobiano efectivo contra diferentes bacterias de la cavidad oral. Nagayoshi *et al* en el 2004, probaron la eficacia del agua ozonizada en la supervivencia de microorganismos orales como *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis*. Estas eran más susceptibles al agua ozonizada que los *Streptococos Orales positivos* y *C. albicans*.

El análisis de los resultados de esta investigación revela que *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* son bastantes sensible frente al ozono y se inhibe su crecimiento de una forma significativa.

El agua ozonizada (4 mg / l) se ha encontrado eficaz para matar los microorganismos gram-positivos y gram-negativos orales y *Candida albicans* orales en cultivo puro, así como bacterias en el biofilm de la placa, por lo tanto podría ser útil como un enjuague bucal para controlar microorganismos infecciosos orales en la placa dental (Srikanth et al, 2013). La mayoría de los enjuagues se indica por 30 seg hasta 1 min luego del cepillado, en este estudio la bacteria fue expuesta al agua ozonizada por 30 seg y se observó una reducida formación de bacteria, confirmando así que el agua ozonizada puede servir como enjuague bucal y posee un efecto antimicrobiano al usarse por 30 segundos.

En comparación de la eficacia del ozono con la de antiséptico establecido, Clorhexidina frente a microorganismos periodontales. No hubo diferencias significativas en la eficacia de ozono acuoso (20 mg ml [-1]) o el ozono gaseoso (≥ 4 g [-3]) en comparación con Clorhexidina al 2% pero eran más eficaces que la Clorhexidina al 0.12%. Ellos recomiendan una mayor concentración de ozono acuoso y gaseoso (Huth, *et al*, 2011). Como lo fue revisado en este estudio donde se expuso la bacteria a una concentración de ozono de 26.8 ug/ml y se observó un crecimiento significativamente menor.

Se ha confirmado que el agua ozonizada presenta un alto efecto antimicrobiano contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas, siendo las gram-negativas más susceptibles, también las bacterias anaerobias son sensibles al ozono a diferencia de *Candida albicans* que es más resistente (90%) luego de ser incubada y expuesta a una alta concentración de agua ozonizada (Nagayoshi *et al*, 2004).

El ozono es un irritante para el sistema respiratorio, la inhalación puede causar sequedad de la cavidad oral y garganta, dolor de cabeza y tos. Las dosis recomendadas son de 0.06 ppm por 8 horas por día, 5 días a la semana o 0.3 ppm por 15 minutos (Millar & Hodson, 2007).

Existe controversia sobre la efectividad clínica de la ozonoterapia como adyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica. Recientemente se ha realizado un estudio sobre el efecto del ozono acuoso en la terapia periodontal no quirúrgica, en el cual se demostró que con la aplicación del tratamiento convencional y la irrigación dentro de las bolsas de cada pieza dentaria con ozono acuoso por 30-60 segundos, al finalizar la sesión puede reducir el índice de placa y el sangrado al sondeo a los 3 meses postoperatorio, aunque no encontraron diferencias significativas ante agua destilada (Ebensberger *et al*, 2002).

Además el ozono logró reducir en 25% la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a diferencia de la clorhexidina que no produjo cambio alguno (Kshitish & Laxman, 2010).

Yilmaz *et al*. evaluaron el efecto clínico y antimicrobiano del ozono gaseoso y el láser Er:YAG en la terapia periodontal no quirúrgica y concluyeron que dentro de las limitaciones de su estudio no hubo diferencia significativa en la disminución de patógenos anaerobios entre ambos tratamientos; sin embargo, el mayor cambio de anaerobios se encontró con el láser Er:YAG (Yilmaz *et al*, 2013).

No obstante, un estudio realizado por Dhingra et al. demostró que posterior a un mes de una sola irrigación subgingival de agua ozonizada (0.01 mg 1-1) resultó efectiva para reducir clínicamente la inflamación gingival en pacientes con ortodoncia, por lo que lo recomiendan como un método que puede llevarse a cabo en las citas mensuales de ortodoncia para reducir el control de placa dentobacteriana (Dhingra & Vandana, 2011).

El agua ozonizada puede ser utilizada no solo en medicina, sino también como uso doméstico. Según la NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SSA1-1998, Salud ambiental, Agua para uso y consumo humano. Los requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para tratamiento de agua de tipo doméstico entre otros es que la prueba de potabilidad es aceptable es si el porcentaje de reducción bacteriana es igual o mayor a 95% dependiendo el tipo de microorganismos. En esta investigación el porcentaje de reducción de ambas bacterias expuesta al agua ozonizada fue de 99.9998492%.

8. CONCLUSIONES

Ciertamente al agua ozonizada posee un efecto antimicrobiano en bacterias y otros tipos de microorganismos y es de utilidad en Periodoncia y otras áreas odontológicas.

1. El ozono posee un efecto antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias como son las bacterias del complejo rojo en este caso *P. gingivalis* y *T. forsythia*.
2. El agua ozonizada tiene la capacidad de reducir el 99.9997 % de *P. gingivalis* luego de ser expuesta por 30 seg en una concentración de 26.8 ug/ml.
3. El agua ozonizada tiene la capacidad de reducir el 99.9984% de *T. forsythia* luego de ser expuesta por 30 seg.
4. El ozono al ponerse en contacto con los microorganismos 30 segundos a una concentración de 26.8 ug/ml favorece la disminución de carga bacteriana, ya que actúa efectivamente como un agente antimicrobiano.
5. Puede ser utilizada el agua ozonizada como: material de irrigación y enjuague bucal en pacientes con enfermedad periodontal ya que a los 30 segundos inhibe el crecimiento de bacterias involucradas con la enfermedad periodontal.

APÉNDICES

HOJA DE CAPTURA DE DATOS

| UFC | | UFC | |
|---------|---|---------|---|
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| | 0 | | 0 |
| 0/10= % | | 0/10= % | |
| | % | | % |

LITERATURA CITADA

Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:70–88.

Bui FQ, Johnson L, Roberts J, Hung S-C, Lee J, Atanasova KR, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection of gingival epithelial cells leads to NLRP3 inflammasome-dependent secretion of IL-1 β and the danger signals ASC and HMGB1. *Cell Microbiol*. 2016 Jul;18(7):970–81.

Bodet C, Chandad F, Grenier D. [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol*. 2007;55(3-4):154–62.

Collins LMC, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res* 1987; 66: 1300–1302.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial bio- films: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284: 1318–1322.

Chung HJ, Groene RJ, Son SH, Chung CP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1989; 60: 506–511.

Claffey N, Polyzois I, Ziaka P. An overview of nonsurgical and surgical therapy. *Periodontol 2000*. 2004; 36(1):35–44.

Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* neutrophil manipulation: risk factor for periodontitis? *Trends in Microbiology*. 2014 Aug;22(8):428–9.

Di Bello A, Buonavoglia A, Franchini D, Valastro C, Ventrella G, Greco MF, et al. Periodontal disease associated with red complex bacteria in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 2014 Mar;55(3):160–3.

Dhingra K, Vandana KL. Management of gingival inflammation in orthodontic patients with ozonated water irrigation - a pilot study. *Int J Dent Hyg*. 2011; 9 (4): 296-302.

Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dental Traumatology*. 2002;18:262.

Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):32–7.

Gmür R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal Res* 1989; 24: 113–120.

Gupta G, Mansi B, Ozone therapy in periodontics. *J Med Life*, 2012, 22;5(1):59-67.

Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol* 2001; 6: 138–145.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78–111.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2005;38(1):72–122.

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors in *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999; 20: 168–238.

J Duncan M. Oral microbiology and genomics. *Periodontology* 2000. 2005;38(1):63–71.

Klanova K. Use of Ozone to Reduce Bacteria and Moulds in the Air and on Surfaces. *Indoor and Built Environment*. 2006 Feb 1;15(1):81–4.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 486–505.

Krammer F. Ozone in the dental practice. *Medical applications of ozone*. Norwalk, CT: International ozone association, Pan American committee. 1983; 258-65.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2003;82(5):338–44.

Lee SY. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. *J Oral Sci* 2001; 43: 1–7.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Oxford, UK; Malden, MA: Blackwell; 2003.

Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS. Clinical, immunologic and microbiological features of active disease sites in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 534–540.

Marquez-San Miguel S, Rupf S, Frenzel J, Eschrich K. The effects of extracts from periodontopathic bacteria on human periodontal fibroblasts stimulated with mineralization supplements. *J Oral Sci* 2003; 45: 127–137.

Mättö J, Asikainen S, Vaisanen M L, Rautio M, Saarela M, Summanen P, Finegold S, Jousimies-Somer H. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. Clin Infect Dis. 1997;25:S194–S198.

Mendes RT, Nguyen D, Stephens D, Pamuk F, Fernandes D, Van Dyke TE, et al. Endothelial Cell Response to *Fusobacterium nucleatum*. Infect Immun. 2016 Jul;84(7):2141–8.

Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. J Dent. 2007; 35 (3): 195-200.

Miyamoto M, Noji S, Koikeguchi S, Kato K, Kurihara H, Murayama Y, Taniguchi S. Molecular cloning and sequence analysis of antigen gene tdpA of *Treponema denticola*. Infect Immun 1991; 59: 1941–1947.

Moore WEC, Moore LH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 66–77.

Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. Journal of Immunology Research. 2014;2014:1–8.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. J Endod. 2004;30:778-781.

Newman MG, Takei HH, Carranza. Carranza's clinical periodontology. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 2002.

Patel PV, Kumar S, Vidya GD, Patel A, Holmes JC, Kumar V, Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytol*, 2012, 56(3):277-84.

Shoemaker JM. Ozone therapy: History, physiology, indications, results. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1): 66–70.

Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol*. 1977;48(9):497–504.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134–144.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005;38(1):135–87.

Srikanth A, Sathish M, Sri Harsha AV. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013 Jun;5(Suppl 1):S89–94.

Suchett-Kaye G, Decoret D, Barsotti O. Intra-familial distribution of *Fusobacterium nucleatum* strains in healthy families with optimal plaque control. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 401–404.

Sunnen G. V.: Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. *J. Adv. Med*. 1988;1(3): 159–174.

Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis. *International Journal of Dentistry*. 2013;2013:1–6.

Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek J Periodontol 1980: 51: 668–669.

Tanner ACR, Haffer C, Bratthall Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979: 6: 278–307.

Tondij L. D., Ganichev V. V., Kozin J. O. Osnovni principy ta metody ozonoterapiji v medicine. Charkov, 2001, 18–20.

van Steenberg T J, Bosch-Tijhof C J, Petit M D, Van der Velden U. Intra-familial transmission and distribution of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. J Periodontal Res. 1997;32:345–350.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. J Clin Periodontol 2000: 27: 648– 657.

Yilmaz S, Algan S, Gursoy H, Noyan U, Kuru BE, Kadir T. Evaluation of the clinical and antimicrobial effects of the Er:YAG laser or topical gaseous ozone as adjuncts to initial periodontal therapy. Photomed Laser Surg. 2013; 31 (6): 293-298.

Yun PL, DeCarlo AA, Hunter N. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human α interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polypeptides of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 1999: 67: 2986–2995.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Laura Mariel Morillo Monegro

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

Tesis: EFECTO ANTIMICROBIANO DEL AGUA OZONIZADA EN LOS
MICROORGANISMOS PERIODONTOPAGOGENOS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Santo Domingo, Rep. Dom, el 6 de Diciembre del 1990.
Hija de Jesús Morillo y Yoselin Monegro Mejía

Educación: Egresada de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU) en
Sto. Dgo, grado obtenido Doctor en Odontología.

Experiencia Profesional: Trabajo en Centro de Salud privado en Sto Dgo, Rep Dom.